

09/762304

Europäisches  
PatentamtEuropean  
Patent OfficeOffice européen  
des brevets

REC'D 20 JUN 2000

WIPO

PCT

EPOO/2174

E.J.U

Bescheinigung

Certificate

Attestation

Die angehefteten Unterlagen stimmen mit der ursprünglich eingereichten Fassung der auf dem nächsten Blatt bezeichneten europäischen Patentanmeldung überein.

The attached documents are exact copies of the European patent application described on the following page, as originally filed.

Les documents fixés à cette attestation sont conformes à la version initialement déposée de la demande de brevet européen spécifiée à la page suivante.

Patentanmeldung Nr. Patent application No. Demande de brevet n°

99108495.5

**PRIORITY DOCUMENT**  
 SUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
 COMPLIANCE WITH  
 RULE 17.1(a) OR (b)

Der Präsident des Europäischen Patentamts;  
 Im Auftrag

For the President of the European Patent Office

Le Président de l'Office européen des brevets  
 p.o.

I.L.C. HATTEN-HECKMAN

DEN HAAG, DEN  
 THE HAGUE,  
 LA HAYE, LE  
 12/05/00

THIS PAGE BLANK (USPTO)



Europäisches  
Patentamt

European  
Patent Office

Office européen  
des brevets

**Blatt 2 der Bescheinigung**  
**Sheet 2 of the certificate**  
**Page 2 de l'attestation**

Anmeldung Nr.: 99108495.5  
Application no.: 99108495.5  
Demande n°:

Anmelddatag:  
Date of filing:  
Date de dépôt: 30/04/99

Anmelder:  
Applicant(s):  
Demandeur(s):  
Evotec Analytical Systems GmbH  
40699 Erkrath  
GERMANY

Bezeichnung der Erfindung:  
Title of the invention:  
Titre de l'invention:  
Bestimmung der Chemosensitivität durch Messung der Caspaseaktivität

In Anspruch genommene Priorität(en) / Priority(ies) claimed / Priorité(s) revendiquée(s)

Staat: Tag: Aktenzeichen:  
State: Date: File no.  
Pays: Date: Numéro de dépôt:

Internationale Patentklassifikation:  
International Patent classification:  
Classification internationale des brevets:  
G01N33/50

Am Anmelddatag benannte Vertragstaaten:  
Contracting states designated at date of filing: AT/BE/CH/CY/DE/DK/ES/FI/FR/GB/GR/IE/IT/LI/LU/MC/NL/PT/SE  
Etats contractants désignés lors du dépôt:

Bemerkungen:  
Remarks:  
Remarques:  
Die ursprüngliche Bezeichnung der Anmeldung lautet:  
Chemosensitivitätsmessung über Caspase-Aktivität

---

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

EPO-Munich  
52

30. April 1999

990936ep Me/kk

29. April 1999

### Chemosensitivitätsmessung über Caspase-Aktivität

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Bestimmung der Chemosensitivität von Zellen gegenüber mindestens einer Substanz durch Messung der durch die mindestens eine Substanz ausgelösten Apoptose.

#### **Chemosensitivitätstests**

Die Behandlungs- und Heilungserfolge von Tumorerkrankungen haben seit der Einführung der Chemotherapie stark zugenommen. Beispielsweise lag die Überlebensrate bei kindlicher akuter lymphatischer Leukämie (ALL) Mitte der 60er Jahre bei weniger als 10%. Heutzutage liegt die Heilungschance bei über 70%. Die Medikamente, sog. Zytostatika, werden nach bestimmten Therapieplänen allein oder in Kombination mit anderen Wirkstoffen verabreicht. Mittlerweile gibt es eine unüberschaubare Anzahl verschiedener Therapiepläne, die empirisch ermittelt und ständig weiterentwickelt werden. Das Hauptkriterium für einen verbesserten Therapieplan ist eine bessere Überlebensrate (clinical outcome). Dieses Kriterium trifft für die Mehrheit der Patienten zu. Jedes Individuum besitzt aber eine unterschiedliche Ausstattung an Zellen mit unterschiedlichen Eigenschaften. Dies trifft insbesondere auf die Eigenschaften von Tumorzellen zu. In einigen Studien konnte gezeigt werden, daß die Therapie für eine Subpopulation extrem gut wirkt, während sie für andere Patienten aufgrund von medikamentresistenten Tumoren wenig oder überhaupt nicht wirksam ist. (Lacombe et al., Blood, 84, 716-723

- 2 -

(1994), Smit et al. International Journal of Cancer 51, 72-78 (1992)). Dabei konnte gezeigt werden, daß nicht nur die Wirksamkeit verschiedener Medikamente, sondern auch die wirksame Dosis eines Medikamentes individuell unterschiedlich sein kann. Die Ermittlung der individuellen Dosierung eines Medikamentes ist für den Patienten von Bedeutung, damit er einerseits soviel an Medikamenten bekommt, wie für seine Heilung notwendig ist, und damit andererseits die toxischen Auswirkungen der Therapie und die Wahrscheinlichkeit einer durch die Chemotherapie induzierten sekundären Krebserkrankung so gering wie möglich gehalten wird. So gut die aktuell gebräuchlichen Therapiepläne auch sind, die Fortschritte der letzten Jahre stagnieren hinsichtlich der mittleren Überlebensrate. Eine weitere deutliche Verbesserung der Chemotherapie sollte durch die Erstellung individuell angepaßter Therapiepläne möglich sein.

Um diese Problematik anzugehen, haben einige Forscher versucht, die individuelle Sensitivität von Patiententumoren gegenüber Zytostatika *in vitro* zu messen. Die meisten Chemosensitivitätstests, die gegenwärtig verwendet werden, basieren wenigstens teilweise auf dem von Salmon (Salmon et al. Science, 197, 461-463 (1977)) entwickelten Agar-Tumorkultur-Test. Diese Tests messen die Zellproliferation.

Ein zweiter Typ von Chemosensitivitätstests umfaßt den Ausschluß von (Fluoreszenz)-Farbstoffen oder die Freisetzung des radioaktiven Chromisotops <sup>51</sup>Cr, mit dem die Zerstörung der Zellmembran durch direkte oder indirekte Zytostatikawirkung gemessen wird. Eine Modifikation des früheren Farbstoffausschluß-Tests ist der sogenannte DiSC-Assay (Weisenthal, Kern Oncology 5: 92-103 (1991)), der durch einen zweiten Färbevorgang zusätzlich zwischen normalen und Tumorzellen differenziert.

- 3 -

Der dritte Typ von Chemosensitivitätstests bestimmt Parameter des zellulären Metabolismus als Maß für die Schädigung durch Zytostatika. Dieser Testtyp umfaßt den radiometrischen BACTEC-Test (von Hoff D., Forseth B., Warfel L., in Salmon Trent(Eds.) Human tumor cloning, pp. 656-657, Grune & Stratton, Orlando (1984)) , den MTT-Test (Freund A. et al. European Journal of Cancer 34:895-901 (1998), Kaspers G.J.L. Blood 92:259-266 (1998), Pieters R. et al. Leukemia 12, 1344-1348 (1998), Klumper E. et al. British Journal of Haematology 93:903-910 (1996), Hwang W.S. et al. Leukemia Research 17:685-688 (1993)) und seinen Variationen, den ATP-Test (Kangas L., Gronroos M., Nieminen A., Medical Biology 62: 338-343 (1984)) und den sogenannten FCA-Test (Meitner P., Oncology 5: 75-81, (1991), Rotman B., Teplitz C., Dickinson K., Cozzolino J., Cellular and Developmental Biology 24: f1137-1146 (1988)).

Agar-Kultur-Assays haben den großen Nachteil, daß bei weitem nicht alle Tumorzellen in den Agar-Kulturen wachsen. Dies gilt insbesondere für lymphatische Leukämien und Lymphome (Veerman A.J.P., Pieters R. British Journal of Haematology 74:381-384 (1990)). Beim bekanntesten Vertreter dieses Assay-Typs, dem Clonogenen Assay, liegt der Prozentsatz von auswertbaren Zellpopulationen nur bei 30-40%. Die Zellen müssen sehr lange (10-20 Tage) wachsen, bevor die Auswertung erfolgt. Außerdem ist der Arbeitsaufwand immens.

Die Farbstoff-Ausschluß-Tests wie auch der <sup>51</sup>Cr-Freisetzungstest bestimmen den Anteil von Zellen mit defekter Zellmembran. Diese Tests beinhalten häufig eine Fixierung und anschließende mikroskopische Auswertung der Zellen bzw. die Messung der Radioaktivität im Überstand. Solche Tests sind aufgrund der Messung eines recht groben Parameters, der Zellmembranintegrität, unspezifisch und können nicht zwischen einer spezifischen Anti-Tumor-Wirkung einer Substanz oder einer physikalischen oder z.B. durch eine starke Verätzung oder Oxidation verursachten Zellschädigung durch eine Substanz unterscheiden. Tests dieses Typs sind folglich

- 4 -

auch bei Substanzen positiv, die generell alle Zellen schädigen und damit nicht als Antitumor-Medikament geeignet sind. Der wohl aussagekräftigste Test des Farbstoff-Ausschluß-Typs ist der DiSC-Test. Durch zweifache Anfärbung kann er im Gegensatz zu anderen Farbstoff-Ausschlußtests zwischen der Zellschädigung von Tumorzellen und normalen Zellen unterscheiden. Die Zweifach-Färbung und die anschließende mikroskopische Auswertung sind aber extrem zeitaufwendig. Außerdem variieren die Ergebnisse abhängig von der Person, die die Auswertung durchführt, und dem Bildausschnitt, der unter dem Mikroskop untersucht wird.

Für den radiometrische Tests wie z.B. den  $^{51}\text{Cr}$ -Freisetzungstest gelten ganz generell: Der Einsatz von radioaktiven Isotopen in diagnostischen Tests wird heutzutage wegen des Gefährdungspotentials und der Entsorgungsproblematik zunehmend vermieden. Hinzu kommt, daß inzwischen Fluoreszenz- und Luminiszenztechniken gleiche Sensitivitäten erreichen können bei häufig kürzerer Gesamttestdauer.

Von den Chemosensitivitäts-Tests, die den Metabolismus einer Zelle als Maß für die Proliferation verwenden, wird am häufigsten der MTT-Test und seine Variationen verwendet. Der MTT-Test hat nach einer 4-tägigen Inkubation der Zellen mit diversen Zytostatika eine relativ kurze Testdauer von etwa 4 Stunden. Außerdem können 96 Proben parallel in einer Mikrotiterplatte mittels eines ELISA-Auslesegerätes ausgewertet werden. Dadurch wird ein passabler Durchsatz bei relativ geringem Personalaufwand gewährleistet. Der MTT-Test basiert auf der Umsetzung von 3-[4,5-Dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl-tetrazoliumbromid in ein blaues Formazan-Produkt. Die Umsetzung wird durch Dehydrogenasen katalysiert, die nur in lebenden Zellen aktiv sind. Der MTT-Test ist abhängig von einer konstitutiven Basisaktivität der untersuchten Zellen. Es hat sich aber herausgestellt, daß einige Zelltypen, z.B. besonders häufig einige FAB-Subtypen von akuter myeloischer Leukämie, eine stark verringerte Dehydrogenaseaktivität besitzen (Santini V. et al. Hematological Oncology 7:287-293 (1989)). Die

- 5 -

Chemosensitivität dieser Tumorzellen kann daher nicht mit einem MTT-Test bewertet werden. Ein weiteres Problem sind die entstehenden wasserunlöslichen Formazankristalle. Diese müssen durch Zusatz von organischen Lösungsmitteln z.B. Dimethylsulfoxid oder Isopropanol in Lösung gebracht werden. Die Erfahrung hat gezeigt, daß dadurch Probleme bei der Reproduzierbarkeit des Tests auftreten.

### Apoptose

Durch Arbeiten diverser Forschergruppen (z.B. Sen, S. et al. FEBS Lett. 307:122-127, Darzynkiewicz et al. Cytometry 13: 795-808 (1992), Fulda S., Los M., Friesen C., Debatin K.M. Int. J. Cancer 76:105-114 (1998)) erscheint es wahrscheinlich, daß durch Zytostatika verursachter Zelltod generell über den Mechanismus der Apoptose verläuft. Die Apoptose stellt einen von der Zelle selbst programmierten Zelltod dar, der durch physiologische Faktoren im Organismus induziert werden kann oder durch Chemikalien wie Zytostatika ausgelöst werden kann. Der programmierte Zelltod spielt eine außerordentlich große Rolle bei der Zytostase z.B. des Immunsystems. So werden beispielsweise T-Zellen, die gegen körpereigene Strukturen gerichtet sind, durch die Apoptose aus dem Organismus entfernt. Ansonsten kann es zu Symptomen einer Autoimmunerkrankung kommen, z.B. Lupus Erythematoses, arthritische Erkrankungen oder der Erkrankung durch einen T-Zell Tumor. Substanzen wie der von Makrophagen synthetisierte Tumornekrosefaktor alpha sind natürliche Induktoren der Apoptose.

Apoptose verläuft nach einem programmierten, einheitlichen Schema, bei dem u.a. bestimmte cysteinhaltige Proteasen (Caspasen) aktiviert werden (Cohen G.M. Biochem. J. 326:1-16 (1997)). Die Aktivierung von Caspasen geschieht ausschließlich durch Apoptose und ist daher ein spezifischer Parameter für die Quantifizierung von Apoptose. Bis zu diesem Zeitpunkt sind die Zellmembranen noch intakt und undurchlässig für DNA-bindende Fluoreszenzfarbstoffe wie z.B. Propidiumiodid. Daher ist die Caspaseaktivität ein Parameter für die Wirkung von

- 6 -

Zytostatika, der deutlich früher auftritt, als die Stunden später erfolgende Auflösung der Zellmembran.

Neben dem Zelltod durch Apoptose existiert eine andere Form von Zelltod, die z.B. physikalisch, durch osmotischen Schock, Verätzung oder Oxidation ausgelöste Nekrose. Diese äußert sich durch stark degenerative Schäden an der Zelle.

---

Medenica (US 5736129) bestimmt das Ausmaß der Zellschädigung durch Zytostatika, indem er die Zellen mit Propidiumiodid anfärbt und anschließend die angefärbten Zellen im FACS (fluorescence activated cell sorter) auszählt. Dieser Ansatz hat aber den großen Nachteil, nicht genau zwischen Apoptose und Nekrose zu unterscheiden, und kann demzufolge den spezifischen Wirkmechanismus von Zytostatika nicht erfassen. Außerdem ist der Zellbedarf für eine aussagekräftige Analyse sehr hoch.

Caspase-Aktivitätstests sind zur spezifischen Detektion von Apoptose bestens geeignet, weil nekrotische Schädigungen, die für zytostatische Wirkungen nicht aussagekräftig sind, nicht erfaßt werden (siehe Tabelle 1). Die in den letzten Jahren verwandten Methoden zur Caspaseaktivitätsmessung umfassen die gelelektrophoretische Auftrennung von spezifischen Proteinsubstraten, sowie chromogene und fluorogene Tests, bei denen durch die Caspasen farbige Produkte gebildet werden (s. z.B. Cohen G.M. Biochem. J. 326:1-16 (1997), Stennicke H.R., Salvesen G.S. J. Biol. Chem. 272:25719-25723 (1997)). Diese Tests sind alle dadurch gekennzeichnet, daß die Zellen zu einem bestimmten Zeitpunkt nach Induktion zunächst sedimentiert und mit Puffer gewaschen werden und anschließend durch einen Lysepuffer zerstört werden, damit die Caspasen, die sich bis dahin im Zellinnern befunden haben, das zugegebene Substrat umsetzen können.

- 7 -

Aus dem Waschvorgang ergibt sich aber hinsichtlich einer einfachen, schnellen Testdurchführung mit geringem Zellmaterialbedarf folgendes Problem:

Die Apoptose und damit die Entwicklung der Caspaseaktivität ist ein dynamischer Prozeß, bei dem die Zelle nach einer gewissen Zeit in die sogenannte sekundäre Nekrose übergeht. Beim Waschvorgang werden daher die Caspasen dieser zerstörten Zellen entfernt.

Dadurch erhält man ein Signal für aktuell in Apoptose befindliche Zellen, deren Zahl irgendwann durch sekundäre Nekrose abnimmt. Es ist bekannt, daß das Maximum der Zahl apoptotischer Zellen sowohl vom untersuchten Zytostatikum, als auch vom Zelltyp abhängt. A priori ist nicht bekannt, zu welchem Zeitpunkt die Caspase-Aktivität und damit das Ausmaß der Apoptose gemessen werden muß. Daraus folgt, daß im Prinzip für jeden Patienten mehrere Proben mit z.B. Tumorzellen unterschiedlichen Inkubationszeiten hinsichtlich der Chemosensitivität bestimmt werden müssen. Der Bedarf an primären Patientenzellen wäre dann derartig hoch, daß nur noch die Chemosensitivität eines oder weniger Zytostatika getestet werden könnte. Außerdem wäre der Zeit- und Personalaufwand für die Chemosensitivitätstestung eines einzelnen Patienten extrem hoch.

Aufgabe der vorliegenden Erfindung ist es, die genannten Nachteile des Standes der Technik zu überwinden.

Gelöst wird die Aufgabe durch ein Verfahren zur Bestimmung der Chemosensitivität von Zellen gegen mindestens eine Substanz durch Messung der durch die mindestens eine Substanz ausgelösten Apoptose, wobei die Apoptose durch kumulierte Caspase-Aktivität einer Probe mit Zellen und einem Medium bestimmt wird, indem die Probe mit der mindestens einen Substanz versetzt und inkubiert wird und nach Zerstörung der Zellen die kumulierte Caspase-Aktivität in der Probe gemessen wird.

Wesentlich ist die Messung der kumulierten Caspaseaktivität. Bei diesem Ansatz werden Zellen, z.B. Tumorzellen eines Patienten, mit mindestens einer Substanz (z.B. Zytostatika) einen längeren Zeitraum inkubiert, so daß alle, auch die langsam wirkenden, wirksamen Pharmaka Zeit genug hatten, Apoptose auszulösen. Anschließend wird beispielsweise ein in einem Lysepuffer befindliches Substrat zugegeben und nach erfolgter Zell-Lyse die gesamte entstandene – kumulierte – Caspaseaktivität der Zellsuspension gemessen. Es wurde gefunden, daß durch Zytostatika aktivierte Caspasen auch nach sekundärer Nekrose apoptotischer Zellen aktiv bleiben, die kumulierte Caspaseaktivität mit der Inkubationszeit steigt und ab dem Zeitpunkt, wo zunehmend sekundäre Nekrose stattfindet, auf einem hohen Level bleibt. Die herkömmlich (mit Waschschrift) bestimmte Caspaseaktivität steigt im Gleichschritt mit der kumulierten Caspaseaktivität, nimmt aber mit beginnender sekundärer Nekrose ab (siehe Figur 1). Durch das Prinzip der kumulierten Caspaseaktivität kann somit durch eine einzige Caspaseaktivitätsmessung die Wirkung von Substanzen auf die Patientenzellen bestimmt werden. Dieser Test hat einen geringen Zellbedarf und kann in kurzer Zeit als Routinetest von Laboranten oder technischen Mitarbeitern durchgeführt werden. Durch die leichte Automatisierbarkeit ist der Personalaufwand für die Durchführung des Tests gering. Da der Test auf überall vorhandenen ELISA-Auslesegeräten durchgeführt werden kann, sind keine Geräteinvestitionen erforderlich. Um den Materialverbrauch weiter zu senken, ist eine Miniaturisierung möglich. Es konnte gezeigt werden, daß Zellen in weniger als 10 µl Medium einige Tage in Kultur gehalten werden können. Durch die Senkung der Zellzahl pro Probenkammer auf 100 bis 1000 pro Test werden hochparallele Analysen von Proben mit äußerst wenig Patientenzellen, wie z.B. aus Feinnadelbiopsien, ermöglicht. Der geringe Zellbedarf ermöglicht auch die Hochdurchsatztestung (High Throughput Screening /HTS) von unbekannten Substanzen auf anti-Tumorwirkung.

- 9 -

Wenn die Chemosensitivität von Zellen pathologischer Gewebe über Caspaseaktivität getestet wird, ist es von Vorteil, als Referenz gesunde Zellen des Gewebes sowie dieselben Zellen ohne Substanzzusatz mitzutesten. Insbesondere ist es sinnvoll als Kontrolle eine permanente Zell-Linie, deren Chemosensitivität bekannt ist, mitzutesten, um die Funktionalität des Tests zu dokumentieren und Fehler bei der Testdurchführung zu erkennen.

Als Substanzen kommen z.B. folgende Substanzen in Frage:

A) Zytostatika

Abrin, Amethopterin, Acivin, Aclacinomycin A, Alanin-Mustard, Altretamin, Aminoglutethimid, Aminopterin, Amsacrin (mAMSA), div. anabolische Steroide, Anthrapyrazol, L-Asparaginase, 5-Azacytidin, Bazillus Calmette-Guerin, Bisantren, Buserelin, Busulfan, Butyryloxyethylglyoxal-dithiosemicarbazon, Camptothecin, Carbamat-ester, Carzinophyllin, CCNU, Chlorambucil, Chlorethylmethylcyclohexyl-nitrosoharnstoff, Chlorethylcyclohexylnitrosoharnstoff, Chlorodeoxyadenosin, Corticotropin, Cyproteronacetat, Chlorotrianisen, Chlorozotozin, Chromomycin-A, Cytosinarabinosid (Ara-C), BCNU, Bleomycin, Cis-Platin, Carbo-Platin, Cladribine, Cyclophosphamid, Dactinomycin, Daunomycin, Daunorubicin, Decarbacin, Doxorubicin, DTIC, Dehydroemitin, 4-Demethoxydaunorubicin, Demethyldoxorubicin, Deoxydoxorubicin, Dexamethason, Dibromodulcitol, Dichloromethotrexat, Diethylstilbestrol, Bis-(2-chloropropyl)- DL-Serin, Doxifluridin, Elliptiniumacetat, 4'-Epidoxorubicin, Epirubicin, Epoetin alpha, Erythropoeitin, Esorubicin, Estradiol, Etoposid, Fluoxymesteron, Flutamid, Folsäure, Fotemustin, Ftorafur, 4-FU, Fludarabine-Phosphat, 5-FU, Floxuridin, Galactitol, Galliumnitrat, Goserelin, G-CSF, GM-CSF, Hydrea, Hexamethylmelamin (HMM), Hydrocortison, Hydroxyprogesteron, 4-Hydroperoxycyclophosphamid, ICRf 159, Idamycin, Ifosfamid, Immunglobulin

- 10 -

IGIV, Interferon, Kobalt-Proporphyrinkomplex, Leucovorin Calcium, Leuprolid, Levadopa, Levothyroxin, Lindan, Liothyronin, Liotrix, Lomustin, Levamisole, Masoprocol, Maytansin; Menogaril, 6-Mercaptopurin, Methosalen, Méthylesteron, Methyl-lomustin, Mithracin, Mithramycin, Mitotan, Mitoxantron, Methotrexat (MTX), 6 MP, Mechlorethamin-Hydrochlorid, Medroxyprogesteron, Megestrolacetat, Melphalan, Mesna, Mitomycin-C, Nandrolon, Natriumphosphat P32, Navelbin, Neocarzinostatin, Nitrofururazon, nHuIFNa, nHuIFNb, nHuIFNp, Octreotidacetat, Ondansetron Hydrochlorid, Dinatrium-Pamidronat, Pentamethylmelamin (PMM), Pentostatin, Peptiochemio, Plicamycin, Prednimustin, Probroman, Procarbazin, Profiromycin, Paraplatin, Prednisolon, Prednison, RazoxanrIFNa-2a, Rubidazon, rIFNa-2b, rIFNb-1b, rIFNt-1b, rIL-2, rTNF, Semustin, SPG 827 (Podophyllinderivat), Spirogermanium, Streptonigrin, Somatostatin, Streptozocin, Tamoxifen, Taxol, Thio-TEPA, 6-Thioguanin, Tenoposid, Testolacton, Testosteron, 3-TGDR, rTNF, Thyroglobulin, Thyrotropin, Trilostan, Uracil-Mustard, VP-16, Vincristin-(VCR), Vinblastin-(VBL), Verapamil, Vindesin, Vinzelidin, Vitamin A-Säure, Vitamin A-Analoga, Zinostatin.

B) Peptide und Peptoide

C) Nukleinsäuren und -Derivate

D) Peptidnukleinsäuren (PNA's)

E) Hybride aus RNA's, DNA's, PNA's u. Derivate

Die Caspase-Aktivität kann sowohl durch Substratumsatz von fluorogenen oder chromogenen Substraten oder durch Bindung von spezifischen Markern z.B. Antikörper, F<sub>ab</sub>-Fragmente, single chain Antikörper, Aptamere (Strukturen bindende Nukleinsäuren) und/oder sonstige Proteine mit Bindungsstellen für entweder unveränderte (Edukte) oder umgesetzte Caspase-Substrate (Produkte) gemessen werden. Insbesondere ist die Verwendung von Aminocoumarin-DEVD als fluorogenes Substrat geeignet.

- 11 -

Markermoleküle, die spezifisch entweder Edukte oder Produkte von Caspasereaktionen binden können, können entweder einen Farbstoffanteil, ein kolloidales Metall (z.B. Silber, Gold), ein radioaktives Isotop und/oder Seltenerdenmetallchelate aufweisen.

---

Die kumulierte Caspaseaktivität wird insbesondere frühestens 10 h (insbesondere 24 bis 48 h) nach dem Versetzen der Probe mit der mindestens einen Substanz gemessen, da erst dann auch langsam wirkende Zytostatika Apoptose ausgelöst haben. Da Apoptose ein sehr früher Marker für die Wirksamkeit von Zytostatika ist, ist der beschriebene Test deutlich schneller als z.B. der MTT-Test mit 4 Tagen Inkubationsdauer.

Es ist wichtig, die Caspaseaktivität gleicher Zellzahlen nach Apoptose zu vergleichen. Es empfiehlt sich daher, das Ausmaß der Apoptose auf die Gesamtzahl der untersuchten Zellen zu normieren. Dies kann z.B. durch Messung der Lichtabsorption, Streulicht, Leitfähigkeitsmessung oder mikroskopisches Auszählen geschehen. Die Normierung ist notwendig, um das Ausmaß der Zellschädigung durch verschiedene Zytostatika vergleichen zu können.

Beispiel:

*Ein stark wirkendes Zytostatikum, das das Wachstum der Zellen unmittelbar stoppt und alle Zellen in Apoptose überführt, kann aufgrund der geringen Zellzahl deutlich weniger Apoptose aufweisen, als im Falle eines schwächer wirkenden Zytostatikums, bei dem sich die Zellen zunächst noch vermehren können, um dann erst später zu einem geringen Teil in Apoptose zu gehen. Erst die Normierung berücksichtigt die Apoptose in Bezug auf die Gesamzellzahl und bewertet das stärker wirkende Zytostatikum richtig.*

- 12 -

Die Chemosensitivitätstestung von Zellen lässt sich besonders vorteilhaft mit einem Kit durchführen. Dieser Kit beinhaltet einen Probenträger mit mehreren Probenkammern, wobei eine Probenkammer mindestens eine Substanz enthält. Pro Kit ist außerdem eine standardisierte Lösung eines Reagenz zur Messung der Caspase-Aktivität enthalten. Das Caspasesubstrat ist insbesondere Aminocoumarin-DEVD in einem Lysepuffer. Es kann auch ein Caspase Aktivitäts Standard enthalten sein. Bei dem Probenträger kann es sich z.B. um eine handelsübliche Mikrotiterplatte handeln. Die zu testenden Substanzen hängen von der Applikation ab und können vorgefertigt in den Kammern des Probenträgers entweder in Lösung oder eingetrocknet vorliegen. Die Substanzen können dabei entweder als Trockensubstanz, in Lösung oder in Gegenwart von Matrixsubstanzen wie z.B. Salzen, Puffer, Kohlenhydraten, Carbonsäuren, Pyrimidinen, anorganischen oder organischen Nanopartikeln bis 1 µm Durchmesser vorliegen.

Fig. 1 zeigt die kumulierte und konventionell gemessene Caspaseaktivität von Jurkat-Zellen, die 4 h mit Actinomycin D induziert wurden.

Fig. 2 zeigt die unterschiedlichen Zeitverläufe der Apoptose in Jurkat- und U937-Zellen nach Induktion durch Actinomycin D.

### Beispiele

#### Beispiel 1

Die Caspaseaktivitäten von 250000 Jurkat-Zellen in 100 µl Medium wurden nach verschiedenen Inkubationszeiten mit 1 µg/ml Actinomycin D konventionell und nach dem erfindungsgemäßen Verfahren der kumulierten Caspaseaktivität bestimmt. Dazu wurden 100 µl Jurkat-Zellen ( $2.5 \times 10^6$ /ml) in Gegenwart von

- 13 -

Actinomycin D bei 5 % CO<sub>2</sub> und 37°C in RPMI-Medium mit 10 % FCS + Pen-Strep inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Zellen nach konventioneller Methode zentrifugiert und mit PBS gewaschen. Das Pellet wurde in 200 µl Lysepuffer resuspendiert, 10 min auf Eis inkubiert und bei -20°C eingefroren. Die kumulierte Caspaseaktivität wurde bestimmt, indem 100 µl der mit Actinomycin D inkubierten Zellen direkt in Suspension mit 100 µl 2x Lysepuffer gemischt werden.

Das Lysat wurde ebenfalls bei -20°C eingefroren. Alle Lysate wurden gemeinsam aufgetaut und mit Aminocoumarin-DEVD versetzt. Bei Raumtemperatur wurde die Freisetzung von fluoreszentem Aminocoumarin durch die Caspase alle 5 min. über eine Dauer von 2 h verfolgt. Aus dem linearen Signalanstieg wurde die Steigung als Maß für die Caspaseaktivität berechnet. Die in der Figur nicht gezeigten spontanen Caspase-Aktivitäten der Jurkat-Zellen in Abwesenheit von Actinomycin D nehmen mit der Zeit zu, bleiben aber kleiner als 4 min<sup>-1</sup>.

## Beispiel 2

Die Caspaseaktivität von Jurkat- und U-937-Zellen wurde nach unterschiedlichen Inkubationszeiten mit Actinomycin D bestimmt. Dazu wurden je 0.5x10<sup>6</sup> Zellen in 1 ml RPMI 1640 Medium mit 10 % FCS und Pen/Strep zwischen 30 Minuten und 16 Stunden mit 1 µg/ml Actinomycin D auf Zellkulturplatten (48 well) inkubiert. Anschließend wurden die Zellen in Eppendorf-Cups überführt und zweimal mit Medium gewaschen. Dann wurde das Pellet in Lysepuffer resuspendiert. Nach 10 Minuten auf Eis wurden 50 µM Aminocoumarin-DEVD-Substrat zugegeben und die Caspaseaktivität hier bei 37°C alle 5 min über einen Zeitraum von 2 Stunden verfolgt. Die Fluoreszenz wurde bei 355 nm angeregt und die Emission bei 460 nm gemessen. Aufgetragen ist der zeitliche Anstieg der Fluoreszenzemission gegen die Inkubationszeit mit Actinomycin D.

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

---

EPO-Munich  
52

- 14 -

30. April 1999

### Ansprüche

1. Verfahren zur Bestimmung der Chemosensitivität von Zellen gegen mindestens eine Substanz durch Messung der durch die mindestens eine Substanz ausgelösten Apoptose, wobei die Apoptose durch kumulierte Caspase-Aktivität in einer Probe mit Zellen und einem Medium bestimmt wird, indem die Probe mit der mindestens einen Substanz versetzt und inkubiert wird und nach Zerstörung der Zellen die kumulierte Caspase-Aktivität in der Probe gemessen wird.
2. Verfahren gemäß Anspruch 1, wobei die Zellen tierische oder humane Zellen sind, insbesondere Leukämiezellen, Zellen solider Tumore, Zellen pathologischer Organe und/oder Referenzzellen wie beispielsweise Zellen aus anderen als den pathologischen Organen oder Zellen aus gesunden Bereichen pathologischer Organe.
3. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 2, dadurch gekennzeichnet, daß als Substanzen pharmazeutische Wirksubstanzen, Chemotherapeutika, Umweltschadstoffe, Peptide, Nukleinsäuren oder Derivate hiervon, PNAs und/oder Nukleinsäurehybride eingesetzt werden.
4. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 3, wobei die Caspase-Aktivität durch Substratumsatz von fluorogenen oder chromogenen Substraten oder durch Bindung von spezifischen Markern wie Antikörpern, F<sub>ab</sub>-Fragmenten, single chain Antikörpern, Aptameren (Strukturen bindende Nukleinsäuren) und/oder sonstige Proteinen mit Bindungsstellen für entweder unveränderte (Edukte) oder umgesetzte Caspase-Substrate (Produkte) gemessen wird.

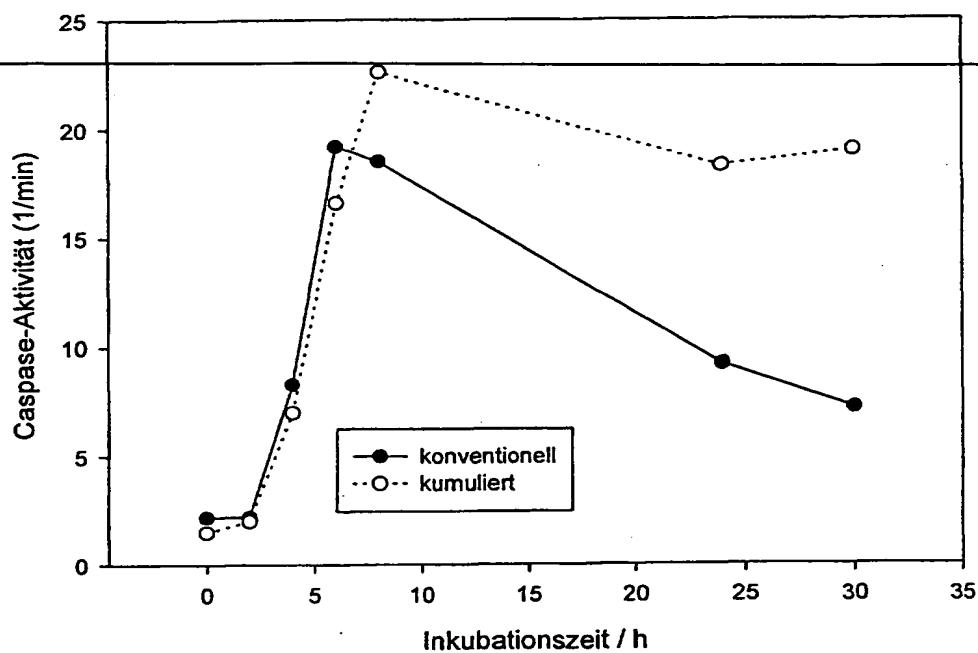
- 15 -

5. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, daß der Marker einen Farbstoffanteil, ein kolloidales Edelmetall, ein radioaktives Isotop und/oder Seltenerdenmetallchelate aufweist.
6. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 5, wobei die kumulierte Caspase-Aktivität frühestens 10 h, insbesondere 24 bis 48 h nach dem Versetzen der Probe mit der mindestens einen Substanz gemessen wird.
7. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 6, wobei die gemessene Caspaseaktivität auf die Gesamtzellzahl normiert wird.
8. Kit enthaltend einen Probenträger mit Probenkammern, wobei die Probenkammern mindestens eine Substanz enthalten sowie eine standardisierte Lösung eines Reagens zur Messung der Caspase-Aktivität.
9. Kit nach Anspruch 9, wobei die Substanzen als Trockensubstanz, in Lösung oder in Gegenwart von Matrixsubstanzen vorliegen.
10. Kit nach einem der Ansprüche 9 bis 10, wobei die Matrixsubstanzen Salze, Puffer, Kohlenhydrate, Carbonsäuren, Pyrimidine, anorganische oder organische Nanopartikel bis 1 µm Durchmesser sein können.

1/2

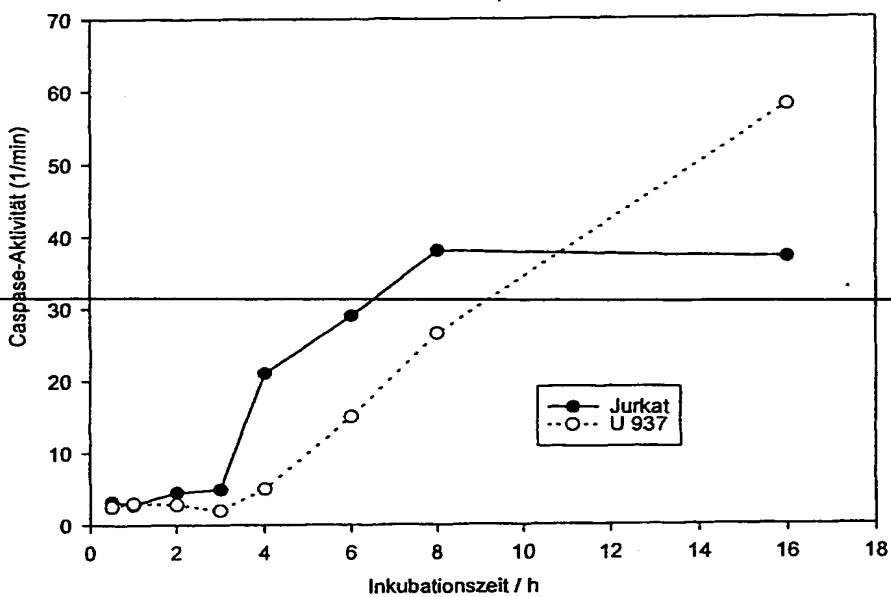
EPO-Munich  
52

30. April 1999



Figur 1

2/2



Figur 2

EPO-Munich  
52

- 16 -

30. April 1999

Zusammenfassung

Verfahren zur Bestimmung der Chemosensitivität von Zellen gegen mindestens eine Substanz durch Messung der durch die mindestens eine Substanz ausgelösten Apoptose, wobei die Apoptose durch kumulierte Caspase-Aktivität in einer Probe mit Zellen und einem Medium bestimmt wird, indem die Probe mit der mindestens einen Substanz versetzt und inkubiert wird und nach Zerstörung der Zellen die kumulierte Caspase-Aktivität in der Probe gemessen wird.

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**